



Magneti-G DYKDDDDK标签免疫沉淀/免疫共沉淀试剂盒

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 使用方法.....	2
3. 注意事项.....	3
4. 参考信息.....	4
5. 常见问题与解答.....	4
6. 试剂盒组成.....	5
7. 订购信息.....	5
8. 相关产品.....	5

1. 产品介绍

1.1 Magneti-G 商标

Magneti-G 商标来自于磁性 (Magnetic) 的英文谐音, G 为高聚物的汉语拼音的首字母, 因此带有这一商标的产品, 均为高聚物材质的磁性微球。这一商标主要用于一系列基于抗体亲和方法的标签蛋白 IP 试剂盒, 目前已有 Anti-His-tag、Anti-Myc-tag、Anti-HA-tag、Anti-DYKDDDDK-tag、Anti-GFP-tag 和 Anti-RFP-tag 六种标签 IP 试剂盒。后续将根据客户的需求, 基于 Magneti-G 高聚物磁珠开发更多相关产品。

1.2 DYKDDDDK 标签

DYKDDDDK 肽段是融合蛋白表达纯化过程中最常用的标签 (tag) 之一。它可以连接在融合蛋白的 N 端、C 端或序列中间, 具有极好的亲水性, 更容易展示在融合蛋白的表面, 干扰融合蛋白功能的可能性较小。这一标签还具有一个优势: 连接在目的蛋白的 N 端时, 可以被 Enterokinase (EK protease) 从序列 C 端赖氨酸的位置切除, 而不留下冗余残基。

1.3 Anti-DYKDDDDK 抗体

DYKDDDDK 肽段也经常被称为 Flag 肽段, 是 Sigma 公司的注册商标。大约四十年前, 该公司最早筛选了一系列抗 DYKDDDDK 标签的抗体, 分别命名为 Anti-Flag M1, Anti-Flag M2, Anti-Flag M5 等, 其中 M2 抗体广泛用于免疫杂交、免疫沉淀、亲和纯化等方向。本公司目前有两株 Anti-DYKDDDDK 抗体, 亲和力和都要高于 Anti-Flag M2 抗体, 更适合做 WB、IP 等蛋白互作实验。抗体带有 biotin 修饰的人源化恒定区 (hFc), 可以被 SA-HRP、SA-RPE 识别, 利于更高效的使用化学发光或者荧光方法进行检测。

1.4 试剂盒组分

抗体与对应的标签之间有特异性的结合, 将抗体偶联在 Beads 上, 就可以把带有对应标签的融合蛋白结合到 Beads 上。经过缓冲液去除杂蛋白等步骤之后, 融合蛋白可以使用变性剂或者高温处理等方式从 Beads 上洗脱下来。为方便使用, 本试剂盒提供多种试剂方便客户更好的进行蛋白互作实验, 具体的组份见表 1。

表1: 试剂盒组分

试剂盒成份	名称	特征
蛋白磁珠	Magneti-G Anti-DYKDDDDK Beads	偶联了标签抗体的磁性高聚物微球
裂解缓冲液	IP Lysis Buffer A (5×)	细胞清洗之后重悬细胞, 也可以用来稀释高浓度的去污剂
	IP Lysis Buffer B	含有高浓度的去污剂, 能够打开细胞膜释放蛋白
洗脱液	Elution Buffer D	含有变性剂和离液剂, 蛋白失活
蛋白上样缓冲液	SDS Loading Buffer (2×)	重悬磁珠后高温处理5-10min, 能够将目的蛋白煮下来
阳性对照	红色荧光蛋白 (DYKDDDDK标签)	带有DYKDDDDK标签的红色荧光蛋白



1.5 洗脱缓冲液说明

Elution Buffer D 含有高浓度尿素以及去垢剂, 可以充分洗脱标签蛋白, 且能保证磁珠上的抗体只有很少量的脱落, 但是有可能在磁珠上仍有少量目的蛋白残留; 也可以直接加入试剂盒中的 SDS Loading Buffer, 95-100°C 高温处理 5-10min, 目的蛋白能够完全从磁珠上脱离, 但是抗体也会完全脱落, 后续 WB 实验时需要慎重选择二抗的种属。

1.6 阳性对照蛋白

试剂盒提供了带有 DYKDDDDK 标签的红色荧光蛋白, 这一蛋白在自然光下带有肉眼可见的红光, 可以用来验证 Beads 的结合载量, 以及排除操作流程中可能出现的偏差。这一蛋白为真核表达, SDS-PAGE 上显示为 3 条具有不同分子量的条带。带有 DYKDDDDK 标签的不同蛋白与 Beads 的结合时间、结合条件、洗脱条件具有类似性, 可以平行参考。但是考虑到蛋白质与 Beads 的结合是浓度依赖的关系, 阳性对照蛋白的操作条件不宜一成不变的照搬。

1.7 磁珠性质

高聚物磁珠采用高分子聚合技术将超顺磁性材料和高分子材料完美地结合在一起, 具有更快的磁响应性同时保持微球良好的分散性、极低的非特异性吸附和更丰富的结合位点。Magnet-G Anti-DYKDDDDK Beads 是利用生物素 (Biotin) 和链霉亲和素 (SA) 蛋白之间高亲和力的原理, 首先将 SA 蛋白高密度偶联到 Magnet-G 磁珠上, 再将生物素化 DYKDDDDK 抗体与 SA 高聚物磁珠非共价偶联制备而成, 从而避免化学共价偶联造成抗体的失活, 因此 Magnet-G Anti-DYKDDDDK Beads 具有更高的抗体偶联密度以及抗体比活力。可用于原核和真核细胞裂解物或者培养上清中分泌表达的 DYKDDDDK 标签蛋白的 IP、Co-IP 等蛋白质相互作用实验, 通过磁力架或自动分离仪器对磁珠进行分离, 方法简单、高效便捷。磁珠性能见表 2。

表2: Magnet-G Anti-DYKDDDDK Beads 产品性能

项目	性能
微球基质	高聚物磁性微球
配体	Anti-DYKDDDDK 重组标签抗体, 人源化恒定区
粒径	1 μm
抗体偶联量	50 μg/ml
磁珠浓度	10 mg/ml
储存缓冲液	Tris (pH8.0), 0.02% Tween20, 0.1% proclin300

1.8 保存与运输

运输: 冰袋运输, 不可冻结。

保存: 2-8 °C 冷藏保存, 不可冻结。

2. 使用方法

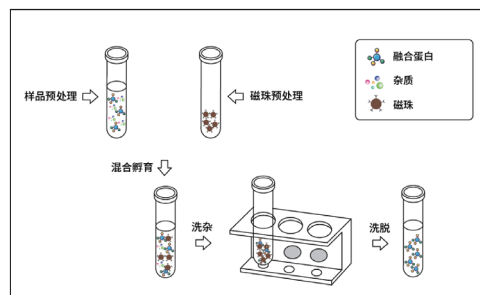


图1. Magnet-G DYKDDDDK 标签免疫沉淀/共沉淀试剂盒使用流程图



2.1 计算磁珠使用量

本产品可用于蛋白质相互作用的实验,我们推荐单次使用 20 μ l 磁珠,少于 10 μ l 磁珠将造成组内不同样本的偏差变大,而过高磁珠用量不仅浪费,还容易造成抗体脱落增多。

2.2 清洗磁珠

将磁珠置于磁力架上静置,待磁珠完全吸附在离心管壁后吸去上清,加入一定体积的 PBST (20 μ l 磁珠建议加入 500 μ l 的 PBST 清洗)轻轻颠倒混匀 3-5 次,再将悬液置于磁力架上,同样待磁珠完全吸附在离心管壁后吸弃上清,重复 3 次。在蛋白质相互作用实验中,因为样品中含有的抗原很少,建议清洗三次,充分洗涤磁珠。除了 PBST 缓冲液 (PBS+ 吐温 20),其它常用缓冲液也可以接受,比如 Tris 缓冲液,醋酸钠缓冲液等。

2.3 样品前处理

真核表达的分泌蛋白可直接取培养上清离心。真核或原核表达的胞内蛋白先用 1 \times PBS (pH=7.4)清洗 3-5 次,随后可用裂解液或超声的方法破碎细胞后取上清离心,再进行后续步骤。核酸是强电性物质,如果核酸吸附到磁珠上,最终将造成杂蛋白增多。除去核酸有两个常用的方法:

- 1) 充分超声可以打断核酸,但过度超声也会造成蛋白降解;
- 2) 使用伯仪生物超级核酸酶 (SLP008) 消化,这一方法需要注意缓冲液的选择。低浓度非离子型表面活性剂,如吐温 -20、曲拉通 -100 可以帮助分散脂类团块,有助于获得更纯的目的蛋白。

本试剂盒提供了快速裂解的方法和相关试剂,首先将 IP Lysis Buffer A(5 \times) 用无菌水稀释成 1 \times IP Lysis Buffer A 再进行后续步骤,表 3 中给出了 1 \times IP Lysis Buffer A 推荐用量:

- 1) 如果是悬浮细胞,细胞清洗后加入 1 \times IP Lysis Buffer A 重悬细胞,再加入 IP Lysis Buffer B 于 1 \times IP Lysis Buffer A 细胞重悬中,IP Lysis Buffer B 的终体积为 0.1% (1ml 1 \times IP Lysis Buffer A 中加 1 μ l IP Lysis Buffer B),上下颠倒混匀 5-10 次,随后置于冰上裂解 5-10min,每 2-3min 可以摇晃一次;
- 2) 如果是贴壁细胞,直接在 1 \times IP Lysis Buffer A 重悬细胞加入 IP Lysis Buffer B,IP Lysis Buffer B 的终体积为 0.1% (1ml 1 \times IP Lysis Buffer A 中加 1 μ l IP Lysis Buffer B),再将裂解液慢慢滴加至细胞孔板中,滴加的时候尽量将整个平皿覆盖,随后置于冰上裂解 5-10min,每 2-3min 可以摇晃一次;
- 3) 如果是原核表达体系,可以直接使用铁锤超级裂解液 (BR0005) 进行裂解。

表3:1 \times IP Lysis Buffer A推荐体积

培养皿大小/细胞数量	1 \times IP Lysis Buffer A体积	备注
100 \times 100 mm	1ml	
60 \times 60 mm	0.5ml	
6 孔板	0.4ml	贴壁细胞
24 孔板	0.2ml	
1 \times 10 ⁶ -5 \times 10 ⁶ cells	1ml	悬浮细胞

2.4 样品孵育

将样本和磁珠的混悬液在常温或者 4 $^{\circ}$ C 下摇晃孵育 30-60 分钟,随后将离心管置于磁力架上,直至磁珠完全吸附在离心管壁后,将上清液转移到另外的管子中,留样备检。20 μ l 磁珠加入 0.5ml PBST 缓冲液进行清洗,轻轻颠倒混匀 5-10 次后将离心管置于磁力架上,待磁珠完全吸附后弃去上清,如此重复 3-5 次。蛋白纯化需要控制温度,我们推荐在较低温度下 (2-8 $^{\circ}$ C) 进行操作,防止蛋白降解。操作时间也至关重要,有时候快速进行实验比加入蛋白酶抑制剂更能保护目的蛋白。这里孵育结合时间不要小于 15 分钟,也不要超过 60 分钟,根据我们的经验,抗体与标签的结合在 15-30 分钟内就接近饱和,更长的孵育时间也没有多少收益。磁珠每次洗涤,加入洗杂缓冲液后可以冰上静置 3-5 分钟。

2.5 蛋白洗脱

试剂盒提供一种变性洗脱液 (Elution Buffer D), 20 μ l 磁珠含量加入 40 μ l 洗脱液,常温或者 4 $^{\circ}$ C 摇晃洗脱,洗脱 5-10 min 即可,随后可进行 WB 检测,但正如之前介绍的,Elution Buffer D 可以充分洗脱标签蛋白,且能保证磁珠上的抗体只有很少量的脱落,但是磁珠上可能有少量目的蛋白残留;

也可以直接选用试剂盒中的 SDS Loading Buffer(2 \times)。首先用 20 μ l PBS 重悬磁珠,再加入 20 μ l 的 SDS Loading Buffer(2 \times),轻轻摇晃混匀后 95-100 $^{\circ}$ C 高温处理 5-10min,这样目的蛋白能够完全从磁珠上脱离,但是抗体也会完全脱落。

3. 注意事项

- 1) 本产品保存在 2-8 $^{\circ}$ C 冰箱中,不要冻结保存;



- 2) 本产品出现轻微团聚属正常现象,可正常使用;
- 3) 不要使用含有 DTT 等还原剂的细胞裂解液样品,DTT 可能会导致抗体配体的脱落;
- 4) 本产品能耐受 $\leq 2M$ 尿素,高浓度的尿素会导致抗体配体脱落;
- 5) 在清洗和洗脱时避免吸取到磁珠,清洗时吸取到磁珠会影响最终的载量,洗脱时吸取到磁珠会影响目的蛋白的质量和电泳效果,第一次洗脱后可以将洗脱液置于新的离心管中,再次置于磁力架上进行吸附。

4. 参考信息

DYKDDDDK tag IP 实验: 样品为胞内表达蛋白,含有 His 和 DYKDDDDK 标签:

- 1) 取 0.5ml 悬浮细胞($\approx 1.5 \times 10^6$ 个)常温下 $1 \times$ PBS (pH=7.4) 清洗三次后快速进行裂解、离心;
- 2) 加入 20 μ l 已经清洗过的磁珠于离心后的上清中摇晃孵育 30min;
- 3) 将含有磁珠的样品管转移到磁力架上,分离磁珠和液体,用移液器吸走上清,留下磁珠;
- 4) 用 PBST 清洗 5 次后加入 SDS Loading Buffer 99°C 高温处理 10min 后进行 WB;
- 5) 检测抗体为 Anti His-HRP mAb,阴性对照 (-) 为不带 DYKDDDDK 标签的蛋白,结果请见图 2。

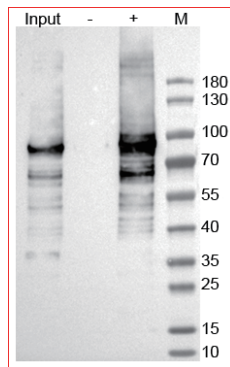


图2.Magneti-G DYKDDDDK 标签免疫沉淀/共沉淀试剂盒进行IP后的WB图

图 2 表明 Magneti-G DYKDDDDK 标签免疫沉淀 / 共沉淀试剂盒能够很好的捕获样品中的 DYKDDDDK 标签融合蛋白, 同时没有非特异性的蛋白结合,能够很好的进行蛋白互作实验。

5. 常见问题与解答

5.1 聚合物磁珠和琼脂糖磁珠有何区别?

- 1) 琼脂糖磁珠是带孔微球,粒径在 30-100 μ m, 交联时很大一部分配体会进入球孔内部,所以偶联载量相对较高,非常适用蛋白的快速纯化;而聚合物磁珠通常粒径为 1-3 μ m 以下,配体主要分布在微球表面,这种类型的磁珠能够快速结合蛋白,空间位阻影响小,非常适合于蛋白互作实验,但其载量不高;
- 2) 我们推荐使用琼脂糖磁珠进行蛋白纯化实验;使用聚合物磁珠进行蛋白互作实验如 IP、Co-IP 和 pull down 实验等。

5.2 为何结合不到目的蛋白?

- 1) 可能是由于蛋白无表达造成的,建议在纯化前用 WB 检测下蛋白原始表达量,如果 WB 无信号,目的蛋白很难捕获;
- 2) 样本中有高浓度的还原剂等干扰物质,建议用合适的裂解液,这时候建议直接超声破碎。



6. 试剂盒组成

试剂盒成分	规格 10T	规格 50T
Magneti-G Anti-DYKDDDDK Beads	0.2ml	1ml
IP Lysis Buffer A(5×)	10ml	25ml×2
IP Lysis Buffer B	0.1ml	0.5ml
Elution Buffer D	0.5ml	2.5ml
SDS Loading Buffer(2×)	0.2ml	1ml
红色荧光蛋白(DYKDDDDK 标签)	0.1mg	0.5mg
说明书	1 份	

7. 订购信息

名称	货号	规格
Magneti-G DYKDDDDK 标签免疫沉淀 / 共沉淀试剂盒	BK0048-01	10T
	BK0048-02	50T

8. 相关产品

类型	名称	货号
Magneti-G标签免疫沉淀/共沉淀试剂盒	Magneti-G His 标签免疫沉淀 / 共沉淀试剂盒	BK0049
	Magneti-G Myc 标签免疫沉淀 / 共沉淀试剂盒	BK0050
	Magneti-G HA 标签免疫沉淀 / 共沉淀试剂盒	BK0051
	Magneti-G GFP 标签免疫沉淀 / 共沉淀试剂盒	BK0052
	Magneti-G RFP 标签免疫沉淀 / 共沉淀试剂盒	BK0053
	生物素化抗体	Anti-Myc Antibody(Biotin)
Anti-DYKDDDDK Antibody (Biotin)		BP0112
Anti-His Antibody(Biotin)		BP0113
Anti-GFP Antibody(Biotin)		BP0114
Anti-HA Antibody(Biotin)		BP0115
Anti-RFP Antibody(Biotin)		BP0116